

DOCKET NO.: 210131US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hayao TANAKA
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HEREWITH
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP99/05979
INTERNATIONAL FILING DATE: 28 OCTOBER 1999
FOR: CONTAINER FOR IMMUNOLOGIC ASSAY

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
JAPAN	10/367404	24 DECEMBER 1998
JAPAN	11/56253	3 MARCH 1999
JAPAN	11/212096	27 JULY 1999

A certified copy of the corresponding Convention application(s) was submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP99/05979**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

**22850**

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

PCT/JP99/05979
28.10.99

097857214

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE

Jr 99 | 5979 JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 DEC 1999

WIPO PGT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年12月24日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第367404号

出 願 人

Applicant (s):

住友パークライト株式会社

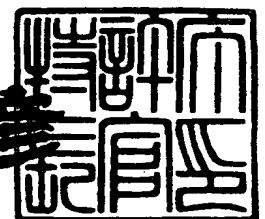
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3083863

【書類名】 特許願
 【整理番号】 PK981204
 【提出日】 平成10年12月24日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【国際特許分類】 C12M 1/00
 【発明の名称】 免疫分析用容器
 【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 秋田市土崎港相染町字中島下27-4 秋田住友ベーク
 株式会社内

【氏名】 田中 速雄

【特許出願人】

【識別番号】 000002141

【住所又は居所】 東京都品川区東品川2丁目5番8号

【氏名又は名称】 住友ベークライト株式会社

【代表者】 守谷 恒夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003539

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫分析用容器

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 分析に用いられる分子の飽和吸着量が $1 \times 10^{-1} \text{ p m o l / c m}^2$ 以下である免疫分析用容器。

【請求項 2】 分析に用いられる分子が、血清を 10%～100% 含む溶液を接触させた際に血清中に含まれる分子である請求項 1 記載の免疫分析用容器。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗原抗体反応を利用して抗体又は抗原を検出する免疫分析における、試薬及び／又は検体の保存、希釈、反応に用いる容器の材質及び表面処理に関するものである。

【0002】

【従来技術】

従来免疫分析においては、使用する試薬または検体の保存及び希釈にポリスチレン又はポリプロピレン製の容器を使用しているが、該容器を用いた場合、非特異的吸着が存在するため、試薬又は検体の種類により差はあるが容器への物理吸着による試薬の減少及び試薬溶液濃度の変化が必ず発生してしまう。

近年、免疫分析法の多様化に伴い、特に製薬メーカーの創薬部門に於いては天然の物質を抽出、精製して使用するケースが多く、そういった物質は総じて非常に微量で高価であり、物理吸着による保存又は希釈工程での試薬の減少は無視することが出来ない。

【0003】

また、臨床検査薬メーカーに於いては、一般的に販売されている臨床検査用のキット価格の約 8 割が固相化試薬の価格で占められており、容器への吸着による試薬の減少を抑えることは、大幅なコストダウンにつながる。

一方測定に使用する容器において、固相化法と呼ばれる免疫分析法では、容器表面に固相化させた蛋白を利用して分析を行うため容器表面に固相化試薬量を増

やすため水酸基等の官能基を導入し親水-疎水のバランスを調節する事で飽和吸着量を増やす、いわゆる高吸着処理がなされたものが使用されている。

【0004】

しかし、近年分析時間の短縮化、大量分析を目的に自動機（ロボット）による分析が開発され、特に製薬メーカーの創薬部門に於いて急速に普及しつつある。

ここで、従来の固相化法の測定工程には固相化されない余剰分子の排除の為に洗浄工程が必要であるが、洗浄液の分注-吸引を繰り返す洗浄工程は自動機にとっては困難な工程であるため、自動機に合わせた測定法として新たに洗浄工程による反応物と未反応物の分離を必要としない、いわゆる逐次添加法が開発されつつある。

【0005】

逐次添加法においては、反応の際に分子の固相化は行わず、反応は溶液中で行われる。よって、前述のような高吸着処理表面を有する容器では不必要な吸着により溶液中の反応を阻害、又は効率を低下させてしまう。

更に、近年の測定技術の進歩により従来の比色法による吸光度測定より高感度を持つ蛍光、発光法による評価技術が確立されてきており、今後そのような高感度の測定系に於いて、不必要な分子の容器への吸着が大きな問題となってくると予想される。

ところが、現在それらに使用されている容器としては吸着に対して考慮された物はなくポリスチレン又は、ポリプロピレンといった成形性、透明性、耐低温性のみを考慮した材料を特に吸着を抑えるための表面処理もせずに用いられており、試薬のロス及び感度の低下の問題を容器の特性の方向から解決するといったアプローチは全くなされていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上述のような従来の問題点を解決すべく鋭意検討の結果なされたもので、分子の非特異的吸着を制御した表面により保存又は希釈中の試薬の減少が無く、溶液反应用の反応容器としても好適に用いることが出来る免疫分析用容器の提供を目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

即ち本発明は、分析に用いられる分子の飽和吸着量が $1 \times 10^{-1} \text{ p m o l / c m}^2$ 以下である免疫分析用容器である。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の容器の形状としては従来用いられているサンプルチューブ、遠沈管、マルチウェルプレート等特に限定するものではないが、サンプルの保存、希釈、反応、測定を1種類の容器で行う目的にはマルチウェルプレートの形状が好適である。

【0009】

ポリスチレン又はポリプロピレンといった従来の容器の吸着量は約 $1 \sim 10 \text{ p m o l / c m}^2$ 又はそれ以上であり、分析に用いる溶液中の分子は溶液の濃度及び容器との接触面積にもよるが、約 $20\% \sim 50\%$ が容器に吸着してしまっている。ここで、吸着した $20\% \sim 50\%$ の分子が溶液中の反応に必須のものであれば、反応効率つまり測定感度は $20\% \sim 50\%$ 低下してしまうこととなり、該吸着した分子が吸着による構造変化のため不必要な反応を引き起こすような物質であれば、大きなノイズとなってしまう。

よって、分析に用いられる分子が全く吸着しない容器が最も理想的であるが、実質的には吸着量を現状の $1/10 \sim 1/100$ にする事で十分に効果が得られる。

【0010】

つまり、溶液中の分子の吸着量は分子の種類及び温度、溶液濃度、溶媒の pH 等によって変動するが、反応容器としては分析に用いられる分子の非特異的吸着量が反応測定を行う濃度、温度、水素イオン濃度条件の下で $1 \times 10^{-1} \text{ p m o l / c m}^2$ 以下であって、血清を使用する場合には通常 $1 \sim 10$ 倍に希釈した血清を用いるため、該血清濃度に於いて血清中に含まれている分子の内、分析に関与及び/または影響を与える分子の非特異的吸着量について反応測定を行う温度、水素イオン濃度条件の下で常に $1 \times 10^{-1} \text{ p m o l / c m}^2$ 以下であればよい。

【0011】

同様に保存、希釈に用いる容器についても保存、希釈に使用する分子の吸着量は保存容器から試薬を取り出す、又は希釈を行う濃度、温度、水素イオン濃度の下で常に $1 \times 10^{-1} \text{ p m o l} / \text{c m}^2$ 以下であればよい。尚、試薬の保存は -80°C といった低温で行われる場合も多いが、吸着は平衡反応であるため保存容器から試薬を取り出す際の濃度、温度、水素イオン濃度における吸着量が $1 \times 10^{-1} \text{ p m o l} / \text{c m}^2$ 以下であればよい。

本発明は蛋白が吸着しないという点で、前に述べた特徴以外に大きな効果を有する。

【0012】

通常、蛋白質は吸着を起こすと構造が変化してしまい、免疫分析に於いては目的とする蛋白が測定系に存在しているにも係わらず構造変化のために検出するための抗体に検知されない場合がある。また、臨床検査等に於いては生体内に存在する状態での血清を検査する必要があるにも係わらず、実際は吸着により構造変化を起こした状態での検査を余儀なくされている。

本発明においては蛋白が吸着しない事により構造変化を起こすことなく、臨床検査に於いては血清をより生体内で存在している状態と近い状態で測定出来る。このメリットは免疫分析容器としては非常に大きいといえる。

【0013】

次に本発明における容器を作製するために使用する材料としては、本発明の特徴とする分子の非特異的吸着量の制御が可能な材料、若しくは本発明の特徴とする分子の非特異的吸着量の制御が可能な表面処理を施した材料で有れば特に限定するものではないが、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 等の高分子が挙げられる又、ポリスチレン、ポリプロピレンの様に非特異的吸着の起こりやすい材料を使用する場合には、プラズマ暴露によるカルボキシル基、カルボニル基及び／または水酸基の導入、ポリメチルメタクリレートを使用する場合であればアルカリによる表面部分加水分解でカルボキシル基を導入する等の表面改質により本発明の特徴とする分子の非特異的吸着量の制御が可能な表面を実現することが出来る。また本発明の特徴とする分子の非特異的吸着量の制御が可能な材料をコ

ーティングしても良い。

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明する。

【0014】

【実施例】

(実施例 1)

市販のポリプロピレン製 96 穴プレート (住友ベークライト製 MS-339 6P) を γ 線 70 kGy での処理を行い、基材表面に水酸基を生成させたものを実施例 1 とした。

(実施例 2)

市販のポリプロピレン製 96 穴プレート (住友ベークライト製 MS-339 6P) に市販のフッ素コート剤 (住友 3M 製 スコッチガード) で表面をフッ素コートしたものを実施例 2 とした。

(比較例)

市販のポリプロピレン製 96 穴プレート (住友ベークライト製 MS-339 6P) を比較例として用いた。

【0015】

(保存容器としての蛋白回収率の比較)

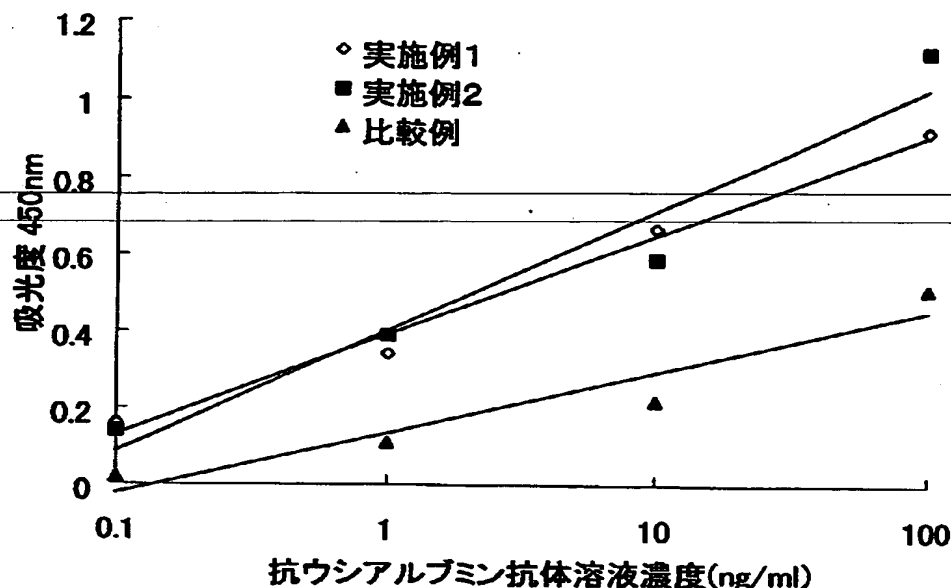
非特異的吸着性を比較するため、酵素で標識した抗ウシアルブミン抗体 (コスモバイオ 製) を 0.1 ng/ml、1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml の濃度系列で、各濃度を 24 ウェルずつ分注し、 -80°C で 48 時間保存、保存後の溶液中の蛋白濃度を基質溶液を用いて測定した。

結果は、図 1 の通りで、実施例 1、実施例 2 のプレートともに比較例に比べ蛋白回収率が高い事を確認した。

【0016】

【図1】

保存後の蛋白濃度(吸光度の比較)



【0017】

(溶液中の反応効率の比較)

溶液中の反応における反応効率を評価するために、実施例1、実施例2、比較例を反応容器として用い、以下の検討を実施した。

ラットアルブミン (コスモバイオ製) のリン酸塩緩衝液 (ダルベッコPBS pH 7.4) 溶液を10 ng/ml、1 ng/ml、0.1 ng/mlの濃度系列で調整し、実施例1、実施例2、比較例のプレートに各濃度4列 (32 well) づつ100 μ l/wellで分注。

【0018】

そこに、ペルオキシダーゼ標識抗ラットアルブミン抗体 (コスモバイオ製) の100 ng/mlリン酸塩緩衝液 (ダルベッコPBS pH 7.4) 溶液を全てのウェルに100 μ l/wellで分注。

37℃で30分反応させた後に、各ウェルの溶液を予め抗ラットアルブミン抗体を固相化しておいたELISA用96穴プレートに移し替えた後再び37℃で30分反応させた。

【0019】

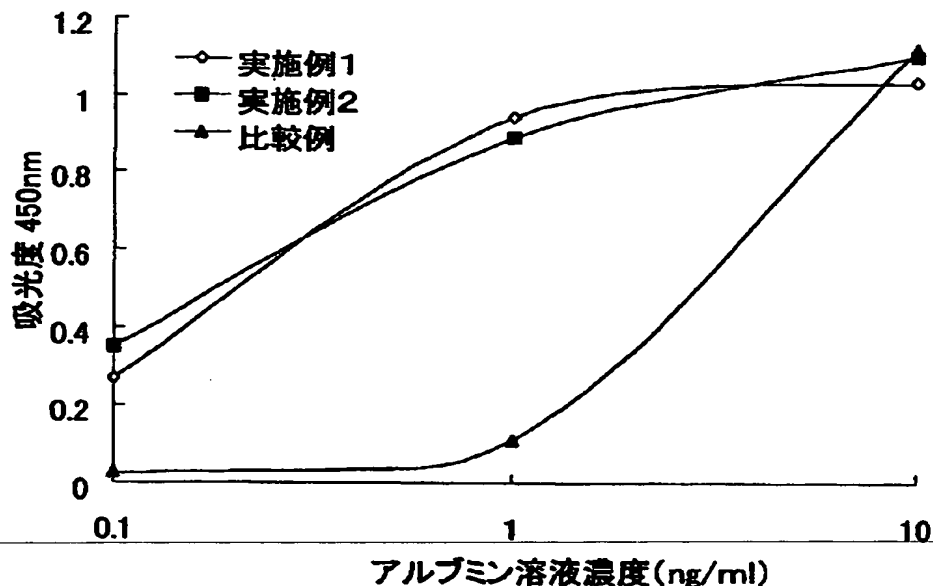
反応後、洗浄液（ダルベッコPBS pH7.4 + 0.05% Tween 20）にて未反応の標識抗ラットアルブミン抗体を洗浄した後、市販のペルオキシダーゼ用発色キット（住友ベークライト製 ML-1120T）を用いて発色、プレートリーダーにより450nmの吸光度を測定した。

結果は図2の通りで、比較例においては低濃度領域での吸光度が低く吸着により溶液中での反応が阻害されているといえるが、実施例においては1、2共に低濃度領域でのアルブミン濃度に対する吸光度値に直線性が得られ、溶液中での抗原-抗体反応が効率よく行われていることが解る。

【0020】

【図2】

溶液中の抗原-抗体反応(吸光度の比較)



【0021】

【発明の効果】

本発明の免疫分析用容器は、測定に使用する分子又は血清の非特異的吸着が20℃～30℃において 1×10^{-1} p m o l / c m²以下である事により試薬の保存、希釈の際の吸着による損失が無く、液層反応系の容器として用いた場合測定分子の吸着による反応効率の低下若しくは不要分子の吸着による反応の阻害が無

く高感度、高精度な測定を行うことが出来る。

又、血清を用いた臨床検査においては、血清成分の吸着による構造変化が起こらない為、より体内に近い条件での検査が可能になる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試薬の損失が少ない保存、希釈容器。及び感度、精度に優れた免疫分析を行うことが出来る免疫分析用基材。

【解決手段】 分析に用いる分子の非特異的吸着が $1 \times 10^{-1} \text{ p mol / cm}^2$ 以下である基材を用いることで、試薬損失、感度低下、精度低下の原因である非特異的吸着を無くさせることで、上記目的の免疫測定用基材を得た。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002141]

1. 変更年月日 1995年 2月10日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都品川区東品川2丁目5番8号

氏 名 住友ベークライト株式会社